中国部分地区柑桔木虱体内感染 *Wolbachia* 的检测及其系统发育分析

王中康[1]，田圣超[1]，贤家旭[2]，陈世伟[2]，刘婷婷[1]，殷幼平[1,*]
（1. 重庆大学生物工程学院，重庆市基因功能与调控重点实验室，重庆 400030；2. 利添生物科技发展（合浦）有限公司，广西北海 536128）

摘要：*Wolbachia* 是一种广泛分布于节肢动物体内的共生细菌，该共生菌经寄主卵的细胞质传播并参与多种寄主生殖活动调控，对节肢动物的物种进化有着重要意义并可能应用于害虫的生物防治。本研究以柑桔黄龙病（Huanglongbing，HLB）的主要传播媒介——柑桔木虱 *Diaphorina citri* 为研究对象，通过 *Wolbachia* 的 16S rDNA、细胞分裂基因（*ftsZ*）、表面蛋白基因（*wsp*）的特异引物对来自于中国广西北海、广西柳州、广东深圳、广东阳春、福建福州 5 个地区的柑桔木虱进行 PCR 扩增，并对扩增产物进行克隆测序，与 GenBank 中相关序列进行比对分析，建立了柑桔木虱共生 *Wolbachia* 的系统发育树。结果显示上述 5 个地区的柑桔木虱均存在 *Wolbachia* 感染，通过 *Wolbachia* 的 16S rDNA，*ftsZ* 基因和 *wsp* 基因 DNA 序列的系统发育分析表明，5 个地区的柑桔木虱体内的 *Wolbachia* 均属于 B 组；基于 *wsp* 基因的系统发育分析进一步表明 5 个地区的亚洲柑桔木虱体内的 *Wolbachia* 属于 B 组的 Con 亚组，且不同地区柑桔木虱体内的 *Wolbachia* 的 16S rDNA，*ftsZ* 基因和 *wsp* 基因序列差异不明显。研究结果为认识柑桔黄龙病传播媒介昆虫的进化及其综合防治提供了重要的参考依据。

关键词：亚洲柑桔木虱；*Wolbachia*；16S rDNA；*ftsZ*；*wsp*；系统发育；柑桔黄龙病
中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2010)09-1045-10

Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*) (Homoptera: Psylloidea) populations in partial areas in China

WANG Zhong-Kang[1], TIAN Sheng-Chao[1], XIAN Jia-Xu[2], CHEN Shi-Wei[2], LIU Ting-Ting[1], YIN You-Ping[1,*] (1. Key Laboratory of Gene Function and Regulation at Chongqing, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 2. Lucky Team Biotech Development (Hepu) Ltd. Co., Beihai, Guangxi 536128, China)

Abstract: *Wolbachia* is a common and widespread group of symbiotic bacteria found in arthropods, which is transmitted through the egg cytoplasm and can manipulate reproduction in their hosts in various ways. So, it has important potential significance on the research of evolution of arthropods and may be used in pest bio-control. Taking the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*), the vector of the Huanglongbing (HLB) pathogen, as the research object, we detected the natural populations of *Diaphorina citri* from five areas, *i. e.*, Beihai and Liuzhou in Guangxi, Shenzhen and Yangchun in Guangdong, and Fuzhou in Fujian, based on PCR amplification, cloning and sequencing of 16S rRNA, *ftsZ* and *wsp* genes. The obtained sequences were aligned with the published ones in database of NCBI, and the phylogenetic relationships among *Wolbachia* types found in *D. citri* and other insect species were analyzed. The results indicated that all the five populations of *D. citri* were infected by *Wolbachia*. The three gene sequences of *Wolbachia* and the phylogenetic tree analysis showed that *Wolbachia* population in *D. citri* belongs to supergroup B. Further phylogenetic analysis based on the *wsp* gene sequences showed that the *Wolbachia* of *D. citri* belongs to Con subgroup. The 16S rRNA, *ftsZ* and *wsp* gene sequences were almost identical in the five geographic populations, respectively, and the identity is up to 99%, showing that these three gene sequences of *Wolbachia* in different geographic populations of *D. citri* had no significant difference. The results can provide useful information for understanding evolution of citrus psyllids and their integrated control.

Key words: *Diaphorina citri*; *Wolbachia*; 16S rDNA; *ftsZ*; *wsp*; phylogeny; Huanglongbing (HLB)

基金项目：国家自然科学基金项目（309771875）；科技部支撑计划重点项目（2007BAD47B03 - 5）；校企合作科研课题（200706-2010-12）
作者简介：王中康，男，1956 年生，四川雅安人，博士，教授，主要从事分子微生物学研究，E-mail：zkwang646@sina.com
* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：ypy128@sina.com
收稿日期 Received：2010-01-27；接受日期 Accepted：2010-07-04

Wolbachia 是一类以节肢动物门及线虫为宿主呈母系遗传的细胞质共生细菌，属于变形菌门（Proteobacteria）的 α 亚门（Werren，1997；Stouthamer *et al*.，1999）。它们能感染昆虫纲、蛛形纲、甲壳纲和丝状线虫等动物，感染率高达 16% ~ 76%（Rowley *et al*.，2004）。该菌能对被感染昆虫等节肢动物的生殖方式进行调控，包括诱导胞质不亲和（cytoplasmic incompatibility）、诱导孤雌生殖（parthenogenesis-inducing）、诱导雌性化（feminizing）、杀雄（male-killing）等生殖调节作用（O'Neill *et al*.，1997；Werren，1997；Ngi-Song *et al*.，1998），这在物种分化等研究上有着重要意义，而且可能在有害生物的防治上具有潜在的作用，如利用 *Wolbachia* 共生细菌干扰丝虫对病毒的传带而使某些疾病得到控制；害虫生物防治中所用的寄生蜂被孤雌生殖 *Wolbachia* 共生后，可诱导孤雌生殖，使寄生蜂生殖率提高而使生防效能增强（龚鹏等，2002）。而 *Wolbachia* 对其宿主的调控和宿主基因组对这些调控的反应可能暗含着性别决定的进化、物种形成和共生关系的重要机理（Breeuwer and Werren，1990；Rigaud and Juchault，1993；Hurst and Schilthuizen，1998），因此近年来 *Wolbachia* 受到系统进化生物学家和害虫生防领域专家的广泛关注。

Wolbachia 还不能在寄主体外获得纯培养，所以需要借助于分子系统学方法进行研究。目前用于 *Wolbachia* 系统发育研究的目的基因，其中包括 16S rDNA、23S rDNA、细胞分裂蛋白基因 *ftsZ*、细菌热激蛋白基因 *groE* 和 *Wolbachia* 表面蛋白基因 *wsp*（O' Neill *et al*.，1992；Rousset *et al*.，1992；Werren *et al*.，1995；Masui *et al*.，1997；Braig *et al*.，1998）。基于 16S rDNA 和 *ftsZ* 序列的系统发育分析将已知的 *Wolbachia* 分为 A ~ H 8 个组（Werren *et al*.，1995；Vandekerchove *et al*.，1999；Lo *et al*.，2002；Czarnetzki and Tebbe，2004；Bordenstein and Rosengaus，2005；Sakamoto *et al*.，2006）。其中绝大多数昆虫感染的 *Wolbachia* 属于 A 和 B 组（Werren *et al*.，1995），线虫感染的 *Wolbachia* 属于 C 和 D 组（Bandi *et al*.，1998），弹尾目昆虫感染的 *Wolbachia* 属于 E 组（Vandekerckhove *et al*.，1999；Lo *et al*.，2002；Czarnetzki and Tebbe，2004），白蚁、蟋蟀、臭虫感染的 *Wolbachia* 属于 F 组（Lo *et al*.，2002；Rasgon and Scott，2004；Sakamoto *et al*.，2006）。随后 Rowley 等人于 2004 年发现澳大利亚蜘蛛感染的 *Wolbachia* 为 A ~ F 组之外的组群，并定其为 G 组，而白蚁 *Zootermopsis nebadensis* 和 *Zootermopsis angusticollis* 感染的 *Wolbachia* 被定为 H 组（Bordenstein and Rosengaus，2005）。目前报道 *wsp* 基因是 *Wolbachia* 基因中进化最快的基因，被广泛应用于 *Wolbachia* 组及组以下类群的检测和分子鉴别（Braig *et al*.，1998；Zhou *et al*.，1998；Jeyaprakash and Hoy，2000；Fukatsu *et al*.，2003）。基于 *wsp* 基因序列的系统发育，将 *Wolbachia* 的 A、B 组细分为 12 个亚群（Zhou *et al*.，1998），在 Zhou 的基础上，van Meer 等（1999）以及 Jeyaprakash 和 Hoy（2000）将 A 群已增加到 10 个群，B 群增加到 11 个群。

柑桔木虱 *Diaphorina citri* 属于同翅目（Homoptera）木虱科（Chermidae），是柑桔黄龙病的主要传播媒介，也是严重的柑桔害虫之一。目前国内外关于 *Wolbachia* 与柑桔木虱共生的报道很少，日本曾经有柑桔木虱存在被 *Wolbachia* 感染的报道（Subandiyah *et al*.，2000），但并未深入研究。国内未见正式报道。

本文应用 PCR 技术对采自中国广西北海、广西柳州、广东深圳、广东阳春、福建福州等主要柑桔产地的柑桔木虱体内 *Wolbachia* 进行了检测，并对 *Wolbachia* 的 16S rRNA，*ftsZ* 和 *wsp* 基因进行了克隆与序列测定。通过与已知昆虫的 16S rRNA，*ftsZ* 和 *wsp* 基因序列进行比对分析，确定亚洲柑桔木虱体内 *Wolbachia* 进化位置，旨在为认识 *Wolbachia* 与寄主木虱的协同进化及潜在的生物防治作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及来源

研究所用的亚洲柑桔木虱采自广西北海、广西柳州、广东深圳、广东阳春和福建福州携带柑桔黄龙病果园的柑桔植株，或黄龙病疫区的木虱寄主九里香 *Murraya psniculata*（L.）Jacks 植株。利用自制的木虱采集器直接吸取柑桔木虱成虫，或将木虱连同嫩梢一起采摘，带回实验室处理。

1.2 亚洲柑桔木虱总 DNA 的提取

随机挑取各地的亚洲柑桔木虱各 20 头，分别放入 1.5 mL 离心管内用烧结封口的 1 mL 塑料头尖捣碎后，加入 400 μL 65℃ 预热的 CTAB 抽提液 65℃水浴 30 min。加入等体积 25∶24∶1 的酚∶氯仿∶异戊醇混匀，10 000 r/min 离心 5 min，取上相加

表 1　柑桔木虱采集样品信息

Table 1　The collecting information of citrus psyllids

种群代码 Population code	采集地点 Collecting locality	经纬度 Longitude and latitude	采集时间 Collecting time	虫数(头) Number of psyllids	寄主植物 Host plants
BH	广西北海 Beihai, Guangxi	21/109	2008.12	100	奥材达夏橙 *Citrus sinensis*
LZ	广西柳州 Liuzhou, Guangxi	24/109	2008.11	100	九里香 *Murraya paniculata*
FZ	福建福州 Fuzhou, Fujian	26/119	2009.01	100	九里香 *M. paniculata*
YC	广东阳春 Yangchun, Guangdong	22/111	2008.09	100	奥材达夏橙 *C. sinensis*
SZ	广东深圳 Shenzhen, Guangdong	22/114	2008.08	100	九里香 *M. paniculata*

入等体积的 25∶24∶1 的酚∶氯仿∶异戊醇重复抽提，10 000 r/min 离心 5 min。取上相移入 UNIQ-10 微滤柱(Sangon，上海)10 000 × g 离心 1 min；用 70% 乙醇清洗两次，最后向柱中加入 50 μL ddH_2O 10 000 × g 离心 1 min 洗脱木虱总 DNA，所得即为 PCR 扩增模板。

1.3　PCR 扩增目的基因

PCR 扩增 16S rRNA 基因片段：16S rDNA 通用引物采用：上游引物 16SwolF(5′-TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT-3′)和下游引物 16SwolFR(5′-GAATAGGTATGATTTTCATGT-3′)(O'Neill *et al.*, 1992)。扩增反应体系为 25 μL，包括：2 μL DNA 模板，17.3 μL ddH_2O，10 ×缓冲液 2.5 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μL，10 mmol/L dNTPs 0.5 μL，25 μmol/L 上游和下游引物各 0.5 μL，5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL。PCR 程序：94℃预变性 3 min，35 个循环(94℃，45 s；52℃，45 s；72℃，90 s)后，72℃延伸 10 min。

PCR 扩增 *ftsZ* 基因片段：*ftsZ* 通用引物采用 Werren 等(1995)：上游引物 *ftsZ* F(5′-GTTGTCGCAAATACCGATGC-3′)和下游引物 *ftsZ* R(5′-CTTAAGTAAGCTGGTATATC-3′)。PCR 扩增反应体系为 25 μL，包括：2 μL DNA 模板，17.3 μL ddH_2O，10 × 缓冲液 2.5 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μL，10 mmol/L dNTPs 0.5 μL，25 μmol/L 上游和下游引物各 0.5μL，5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL。PCR 程序：95℃预变性 3 min，35 个循环(95℃，30 s；52℃，30 s；72℃，90 s)后，72℃延伸 10 min。

PCR 扩增 *wsp* 基因片段：*wsp* 的扩增引物采用(Braig *et al.*, 1998)：上游引物 *wsp*81F (5′-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3′)和下游引物 *wsp*691R (5′-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3′)。PCR 扩增反应体系为 25 μL，包括：2 μL DNA 模板，17.3 μL ddH_2O，10 ×缓冲液 2.5 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μL，10 mmol/L dNTPs 0.5 μL，25 μmol/L 上游和下游引物各 0.5 μL，5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL。PCR 程序：95℃预变性 3 min，35 个循环(94℃，1 min；54℃，1 min；72℃，1 min)后，72℃延伸 10 min。

分别取上述 PCR 扩增产物 8 μL 点样于含溴化乙锭(EB)的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，凝胶成像系统(GelDoc2000，Bio-Rad，USA)观察靶标 DNA 条带。

1.4　PCR 产物的回收及克隆测序

紫外灯下切割回收目标 PCR 产物，将各片段回收产物与 pMD18-T 载体(TaKaRa)16℃连接过夜，再转化到感受态大肠杆菌中(菌株为 JM109)，转化子于含 50 μg/mL 的氨苄抗性的 LB 培养基上 37℃倒置恒温培养 16 h，筛选阳性克隆，随机挑选 3 个阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.5　序列分析

将所得到的序列在美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站上进行序列比对，以确定所得到的是否为 *Wolbachia* 的基因序列并提交注册。使用 DNAMAN 软件分别比较各地区的 *Wolbachia* 的 16S rRNA，*ftsZ* 及 *wsp*3 段基因序列的同源性和差异性。利用 Clustal X 软件分别对所测得的中国柑桔木虱体内感染的 *Wolbachia* 的 16S rRNA，*ftsZ* 及 *wsp* 基因序列和其他昆虫体内已确定所属组群的 *Wolbachia* 的 16S rRNA，*ftsZ* 及 *wsp* 基因序列进行分析排序，然后输入 MEGA4.0.1，建立 NJ 系统树。各个分支的 bootstrap 置信度用 1 000 次自导复制来评价，建立系统发育树，以确定本实验中 *Wolbachia* 的进化地位。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

利用16S rRNA，*ftsZ* 和 *wsp* 3 个基因的通用引物稳定地从5个地区的柑桔木虱总 DNA 中分别扩增出约900 bp，1 000 bp 和600 bp 的片段，表明几个不同来源的亚洲柑桔木虱体内都存在 *Wolbachia* 感染。经克隆测序，3 种引物对5个地理种群的亚洲柑桔木虱体内 *Wolbachia* 的3段基因的扩增片段均分别为896 bp，1 043 bp 和599 bp。3段基因在 NCBI 上的登录号分别为：16S rDNA（BH：GU563888；LZ：GU3889；FZ：GU563890；YC：GU563891；SZ：GU563892）；*ftsZ*（BH：GU480075；LZ：GU480073；FZ：GU480076；YC：GU480077；SZ：GU480074）；*wsp*（BH：GQ385974；LZ：GU488070；FZ：GU488071；YC：GU488072；SZ：GQ385975）。不同地区来源的 *Wolbachia* 扩增片段大小没有差异(图1，2)。

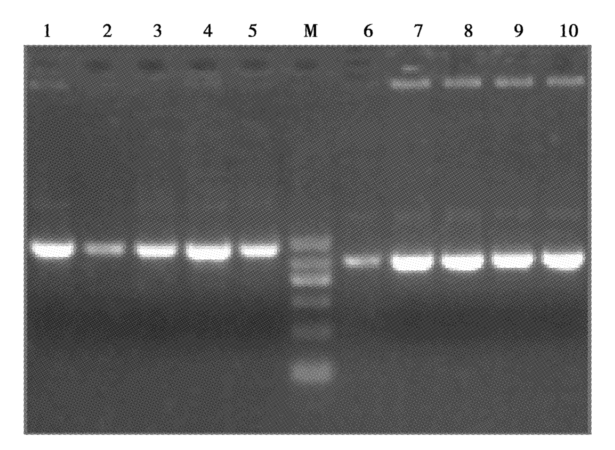


图1 柑桔木虱体内 *Wolbachia* 的16S rRNA 及 *ftsZ* 基因 PCR 特异性扩增

Fig. 1 PCR amplification of the 16S rRNA and *ftsZ* gene from *Wolbachia* in *Diaphorina citri*

M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker Ⅱ；1－5：*ftsZ* gene；6－10：16S rRNA gene：1，6：北海 Beihai population；2，7：柳州 Liuzhou population；3，8：深圳 Shenzhen population；4，9：阳春 Yangchun population；5，10：福州 Fuzhou population.

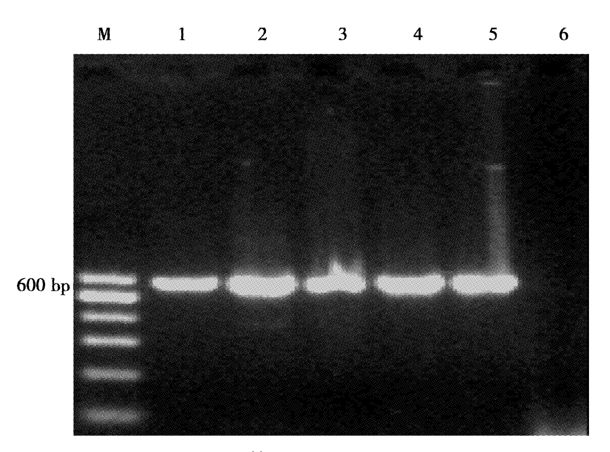


图2 柑桔木虱体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因 PCR 特异性扩增

Fig. 2 PCR amplification of the *wsp* gene from *Wolbachia* in *Diaphorina citri*

M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker I；1：北海 Beihai population；2：柳州 Liuzhou population；3：深圳 Shenzhen population；4：阳春 Yangchun population；5：福州 Fuzhou population；6：空白对照(水) Blank control (H_2O)

2.3 序列分析及系统发育树的建立

将所测得的序列在美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站上进行 BLAST，发现测得的16S rRNA，*ftsZ* 和 *wsp* 基因序列与 GenBank 中注册的众多 *Wolbachia* 的16S rRNA，*ftsZ* 和 *wsp* 基因序列的同源性均达98%以上，可以确认本实验得到的序列为 *Wolbachia* 的16S rRNA，*ftsZ* 和 *wsp* 基因序列，将5个不同地区柑桔木虱所带 *Wolbachia* 的16S rRNA，*ftsZ* 和 *wsp* 基因序列分别使用 DNAMAN 软件进行比对得出，不同地区之间3段基因同源性高达99%以上，不存在明显差异(表2～4)。

表2 由通用引物分别在5个不同地区种群体内扩增出的 *Wolbachia* 株 16S rRNA 的基因序列同源性(%)(下三角)和差异性(%)(上三角)

Table 2 The homology (%) (below the diagonal) and diversity (%) (above the diagonal) of 16S rRNA sequences amplified by universal primers from five different geographic populations

基因 Gene	BH	FZ	LZ	YC	SZ
BH	–	0.22	0	0.22	0.22
FZ	99.78	–	0.22	0	0
LZ	100	99.78	–	0.22	0.22
YC	99.78	100	99.78	–	0
SZ	99.78	100	99.78	100	–

表 3　由通用引物分别在 5 个不同地区种群体内扩增出的 *Wolbachia* 株 *ftsZ* 的基因序列同源性(%)(下三角)和差异性(%)(上三角)

Table 3　The homology (%)(below the diagonal) and diversity (%)(above the diagonal) of *ftsZ* sequences amplified by universal primers from five different geographic populations

基因 Gene	BH	FZ	LZ	YC	SZ
BH	–	0.48	0.38	0.58	0.58
FZ	99.52	–	0.48	0.67	0.67
LZ	99.62	99.52	–	0.58	0.58
YC	99.42	99.33	99.42	–	0.77
SZ	99.42	99.33	99.42	99.23	–

表 4　由通用引物分别在 5 个不同地区种群体内扩增出的 *Wolbachia* 株 *wsp* 的基因序列同源性(%)(下三角)和差异性(%)(上三角)

Table 4　The homology (%)(below the diagonal) and diversity (%)(above the diagonal) of *wsp* sequences amplified by universal primers from five different geographic populations

Gene	BH	FZ	LZ	YC	SZ
BH	–	0	0	0	0.17
FZ	100	–	0	0	0.17
LZ	100	100	–	0	0.17
YC	100	100	100	–	0.17
SZ	99.83	99.83	99.83	99.83	–

本研究所得的 16S rRNA，*ftsZ* 和 *wsp* 基因序列与 GenBank 数据库登录的各组群中具有代表性的 16S rRNA，*ftsZ* 和 *wsp* 基因进行聚类分析得到 3 个 NJ 系统发育树，从 3 段不同基因的系统发育树的拓扑结构可以看出，5 个不同地区的亚洲柑桔木虱体内感染的 *Wolbachia* 归在一个组内，同属于 B 大组。根据 *wsp* 基因建立的系统发育树表明 5 个地区的柑桔木虱属于 B 组的 Con 亚组(表 5，图 3～5)。

3　讨论

Wolbachia 不仅在自然界中分布广泛，而且种类品系繁多。由于它对宿主特殊的生殖调控作用，近年来对 *Wolbachia* 的研究已成为生命科学领域的热点之一。随着研究的不断深入，*Wolbachia* 与其宿主之间的相互关系将被不断地丰富和发展。利用 *Wolbachia* 对宿主的生殖调控作用将为昆虫性别决定系统上的快速进化、植物病害传播媒介昆虫的综合防治等提供新的研究思路和方法。

本研究利用 3 段不同基因分别对来自于中国柑桔主产地的 5 个地区的柑桔木虱携带的 *Wolbachia* 进行了分析，结果显示中国柑桔木虱普遍携带 *Wolbachia*。基于 3 个基因序列构建的系统发育树均表明柑桔木虱体内 *Wolbachia* 属于 B 大组，5 个地区的柑桔木虱体内 *Wolbachia* 的 16S rRNA，*ftsZ* 和 *wsp* 基因序列没有明显差异。分析这种无差异的原因，可能与样品来源柑桔木虱生活地区的地理位置和气候差异小而未形成明显的地理种群有关；也可能是因为中国柑桔木虱种类单一，寄主本身不存在差异，共生菌与昆虫之间长期共存形成协同进化关系，而使 *Wolbachia* 在柑桔木虱体内未形成不同的种群差异。

柑桔木虱是传播柑桔黄龙病的重要昆虫媒介，本实验研究显示，中国南方柑桔木虱体内感染的 *Wolbachia* 属于 B 大组的 Con 亚组。而在 Zhou 等(1998)检测的具有代表性的 28 个 *Wolbachia* 品系中，2 个属于 Con 亚组的 *Wolbachia* 品系均对寄主具有诱导细胞质不亲和(CI)的生殖调控作用，在中国 3 种稻飞虱中感染的 *Wolbachia* 也属于 Con 亚组，交

配结果显示符合 CI 表现规律(甘波谊等，2002)。因此我们推断柑桔木虱内的 *Wolbachia* 有可能同样具有类似的生殖调控作用，但这还需要进一步的研究验证。如果确实是这样，通过分析 *Wolbachia* 与柑桔木虱的协同进化、相互关系，有可能开辟柑桔木虱防治的新途径。一方面可以对木虱体内的共生菌 *Wolbachia* 进行改造使其携带黄龙病菌抗体基因，当工程木虱在群体中扩散并达到一定的种群密度时，使其病菌抗体基因在群体中得以大量表达，于是逐步减弱木虱的携毒能力，最终阻断木虱对病菌的传播；另一方面通过 *Wolbachia* 对宿主的特殊生殖调控如诱导细胞质不亲和等作用来控制柑桔木虱种群数量、以达到控制传播媒介进而切断传播途径的作用。*Wolbachia* 到底能否影响柑桔木虱的生殖调控，是否真具有 CI 作用；*Wolbachia* 在柑桔木虱中是否存在着垂直传播等，很多有关 *Wolbachia* 的具体的分子生物学机制还有待进一步阐明。

表 5 用于构建系统发育树的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列信息

Table 5 *Wolbachia* group nomenclature and their GenBank accession numbers

组 Group	亚组 Subgroup	寄主/*Wolbachia* 品系 Host/*Wolbachia* strain	对寄主作用 Action for hosts	GenBank 登录号 GenBank accession no.
A	Mors	*Glossina morsitans*/*w*Mors	?	AF020078
	Mel	*Drosophila melanogaster* (Aub)/*w*Mel	CI	AF020063
		Drosophila melanogaster (Cairns)/*w*Melcs	NE	AF020064
		Drosophila simulans (Coffs Harbour)/*w*Cof	NE	AF020067
	Pap	*Phlebotomus papatasi*/*w*Pap	?	AF020082
	Ri	*Drosophila simulans* (Riverside)/*w*Ri	CI	AF020070
	Aus	*Glossina austeni*/*w*Aus	?	AF020077
	Ha	*Drosophila simulans* (Hawaii strain)/*w*Ha	CI	AF020068
	Uni	*Muscidifurax uniraptor*/*w*Uni	T	AF020071
	AlbA	*Aedes albopictus*/*w*AlbA	CI	AF020058
	Dro	*Trichopria drosophilae*/*w*Dro	CI	AF071910
	Kue	*Ephestia kuehnlella*/*w*Kue	?	AF071911
B	Con	*Tribolium confusum*/*w*Con	CI	AF020083
		Laodelphax striatellus/*w*Stri	CI	AF020080
	Pip	*Aedes albopictus* (Houston strain)/*w*AlbB	CI	AF020059
		Drosophila simulans (*mauritiana*)/*w*Ma	NE	AF020069
		Culex pipiens (ESPRO strain)/*w*Pip	CI	AF020061
	Ori	*Tagosedex orizicolus* (Delphacidae)/*w*Ori	CI	AF020085
	Dei	*Trichogramma deion* (Texas 203)/*w*Dei	T	AF020084
	Kay	*Trichogramma kaykai* (JT6-3)/*w*KayB	T	AF071924
	Vul	*Armadillidium vulgare*/*w*Vul	F	AF071917
	For	*Encarsia formosa*/*w*For	?	AF071918
	Sib	*Trichogramma sibericum* (SIB)/*w*Sib	T	AF071923
	Div	*Apoanagyrus diversicornis*/*w*Div	F	AF071916

CI：细胞质不亲和 Cytoplasmic incompatibility；F：孤雌生殖 Feminization；NE：没有作用或者是对 CI 的营救作用 No effect or rescue effect of CI；T：产雌孤雌生殖 Thelytoky；?：未知 Unkown.

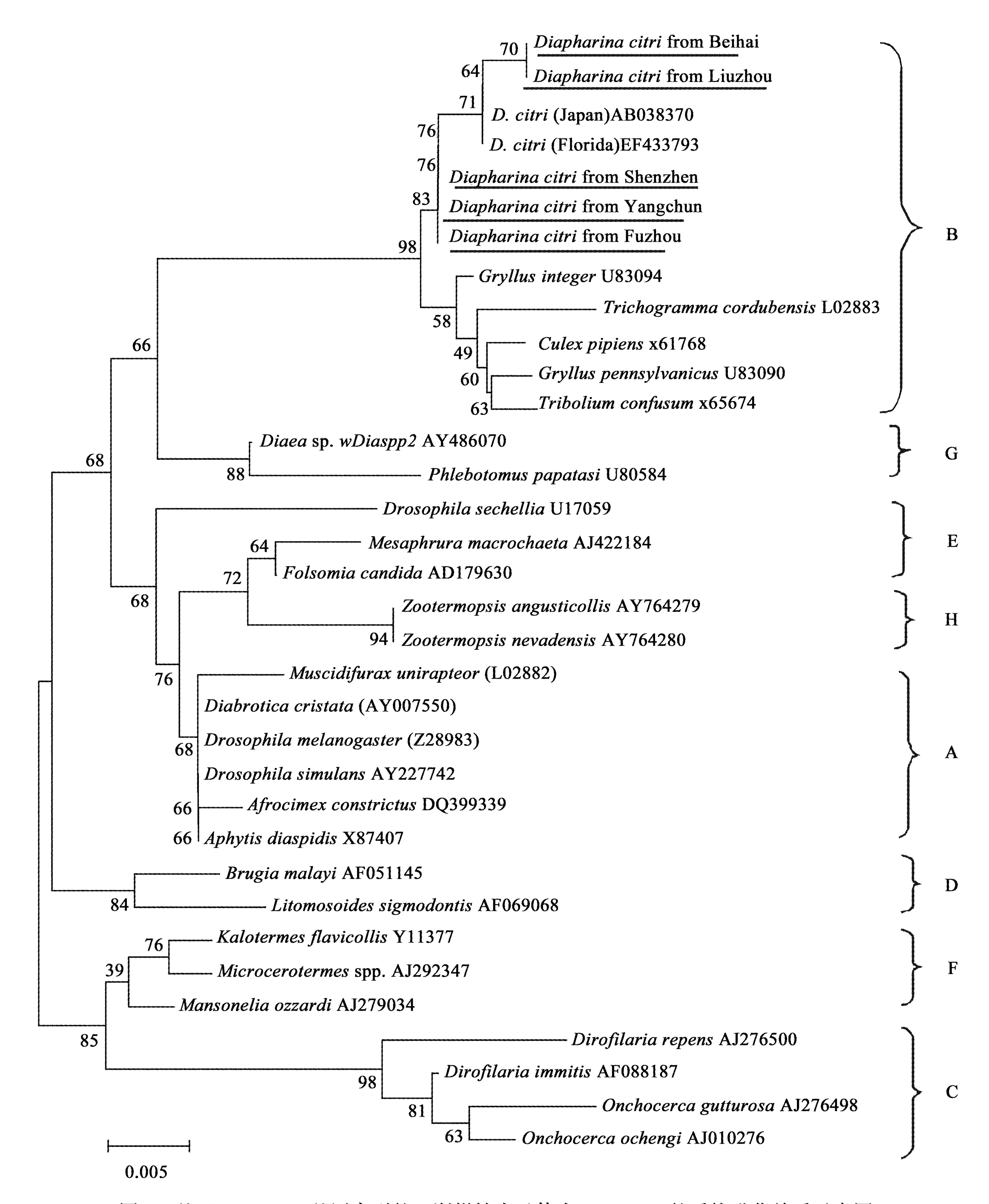


图 3　基于 16S rRNA 基因序列的亚洲柑桔木虱体内 *Wolbachia* 的系统进化关系示意图

Fig. 3　Phylogenetic tree of *Wolbachia* in *Diaphorina citri* based on the 16S rRNA gene sequences

具下划线者为本实验所测定的种群；图 4，5 同。The populations underlined are examined in this study. The same for Figs. 4 and 5.

本实验所采集的亚洲柑桔木虱当中，广西北海和广东阳春的木虱均采自 HLB 发病果园。根据本实验室建立的柑桔黄龙病菌的实时荧光定量 PCR 检测体系（Wang *et al.*，2006）对 5 个地区的亚洲柑桔木虱检测的结果表明北海和阳春的柑桔木虱确实感染有亚洲韧皮杆菌，而深圳、福州和柳州 3 个地区的柑桔木虱未感染病原菌，因此，柑桔木虱体内亚洲韧皮杆菌和 *Wolbachia* 之间及其与寄主相互作用和影响也有待深入研究。

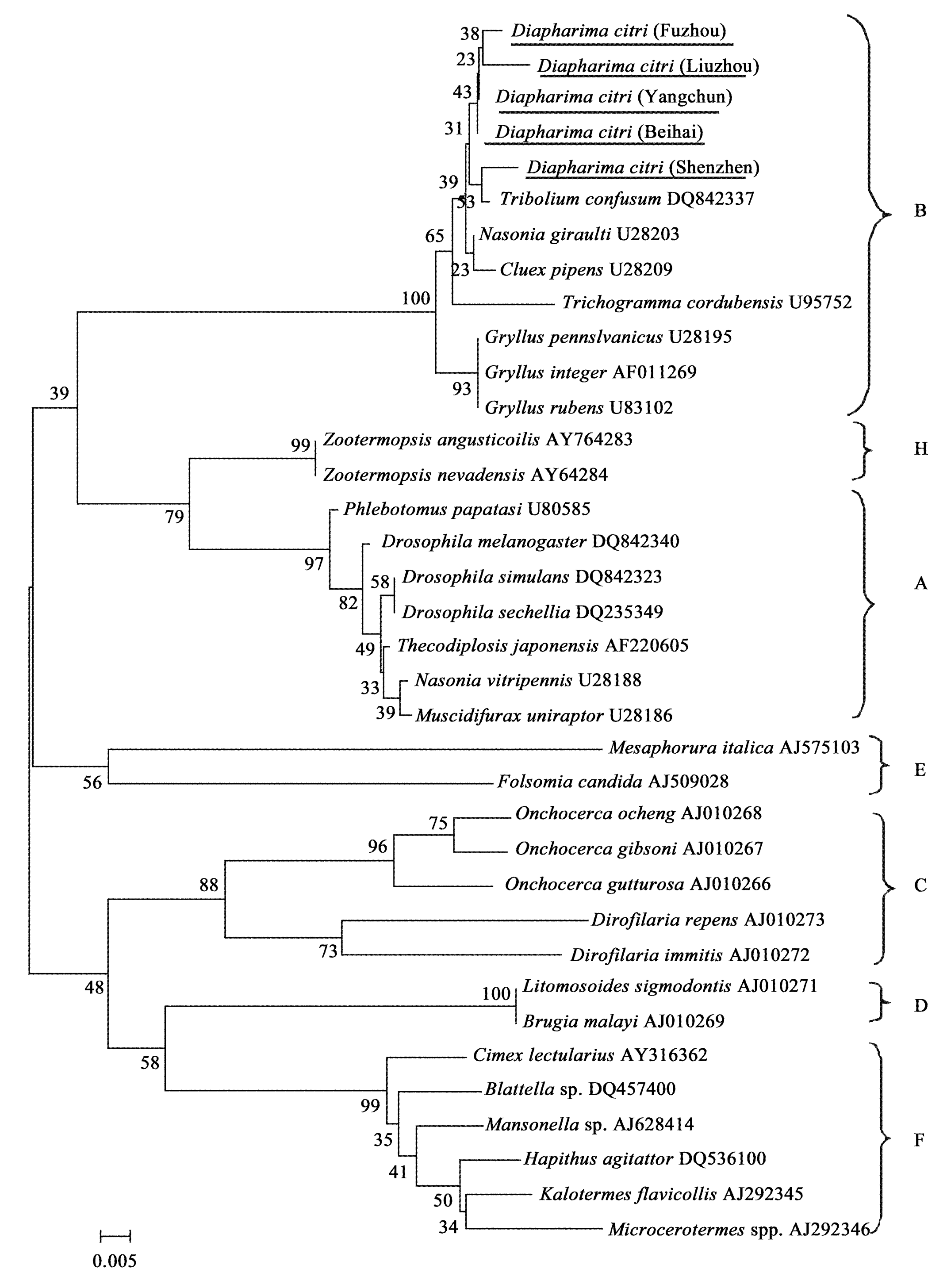


图 4 基于 *ftsZ* 基因序列的亚洲柑桔木虱体内 *Wolbachia* 的系统进化关系示意图

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Wolbachia* in *Diaphorina citri* based on the *ftsZ* gene sequences

参考文献（References）

Bandi C, Anderson TJC, Genchi C, Blaxter ML, 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc. Biol. Sci.*, 265 (1413): 2407－2413.

Bordenstein SR, Rosengaus RB, 2005. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in Isoptera. *Curr. Microbiol.*, 51: 393－398.

Braig HR, Zhou W, Dobson S, O'Neill SL, 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J. Bacteriol.*, 180(9): 2373－2378.

Breeuwer JAJ, Werren JH, 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, 346: 558－560.

Czarnetzki AB, Tebbe CC, 2004. Detection and phylogenetic analysis of

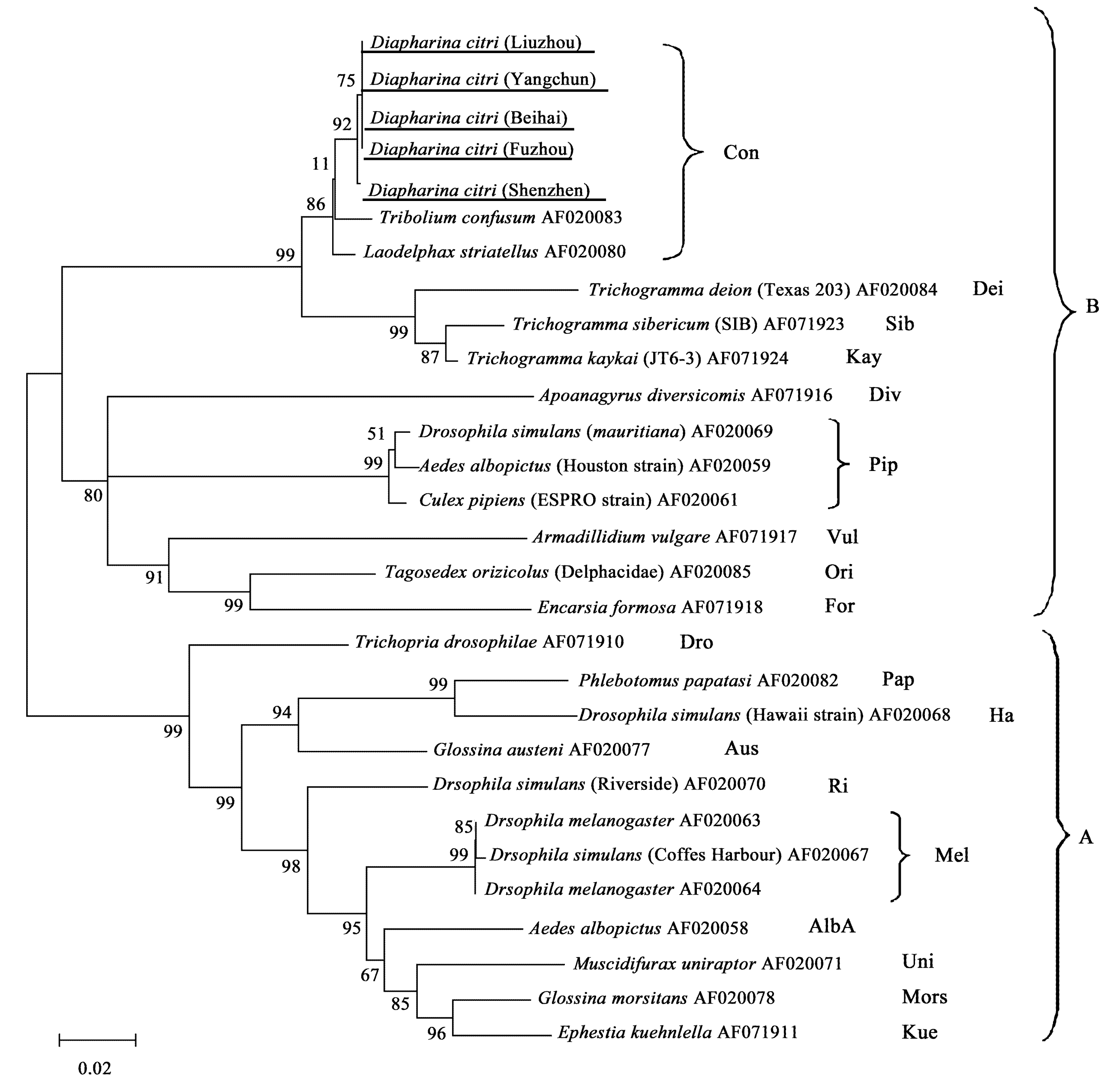


图 5　基于 *wsp* 基因序列的亚洲柑桔木虱体内 *Wolbachia* 的系统进化关系示意图

Fig. 5　Phylogenetic tree of *Wolbachia* in *Diaphorina citri* based on the *wsp* gene sequences

Wolbachia in Collembola. *Environ. Microbiol.*, 6(1): 35－44.

Fukatsu T, Kondo N, Ljichi N, Nikoh N, 2003. Discovery of symbiont-host horizontal genome transfer: a beetle carrying two bacterial and one chromosomal *Wolbachia* endosymbionts. In: Bourtzis K, Miller TA eds. Insect Symbiosis. CRC Press, New York. 305－324.

Gan BY, Zhou WG, Feng LB, Shen DL, Li CB, 2002. Infection of *Wolbachia* in three planthopper species in China. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 14－17. [甘波谊，周伟国，冯丽冰，沈大棱，李昌本，2002. 沃尔巴克氏体在中国三种稻飞虱中的感染. 昆虫学报，45(1): 14－17]

Gong P, Shen ZR, Li ZH, 2002. *Wolbachia* endosymbionts and their manipulation of reproduction of arthropod hosts. *Acta Entomologica Sinica*, 45(2): 241－252. [龚鹏，沈佐锐，李志红，2002. *Wolbachia* 属共生菌及其对节肢动物生殖活动的调控作用. 昆虫学报，45(2): 241－252]

Hurst GDD, Schilthuizen M, 1998. Selfish genetic elements and speciation. *Heredity*, 80: 2－8.

Jeyaprakash A, Hoy MA, 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplifications: *wsp* sequences found in 76% of 63 arthropod species. *Insect Mol. Biol.*, 9: 393－405.

Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C, 2002. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol. Biol. Evol.*, 19(3): 341－346.

Masui S, Sasaki T, Ishikawa H, 1997. groE-homologous operon of *Wolbachia*, an intracellular symbiont of arthropods: a new approach for their phylogeny. *Zool. Sci.*, 14(4): 701－706.

Ngi-Song AJ, Overholt WA, Stouthamer R, 1998. Suitability of *Busseola*

fusca and *Sesamia calamistis* (Lepidoptera: Noctuidae) for the development of two populations of *Cotesia sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae) in Kenya. *Biological Control*, 12(3): 208-214.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2699-2702.

O'Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH, 1997. Influential Passengers. Oxford University Press, New York.

Rasgon JL, Scott TW, 2004. Phylogenetic characterization of *Wolbachia* symbionts infecting *Cimex lectularius* L. and *Oeciacus vicarious* Horvath (Hemiptera: Cimicidae). *J. Med. Entomol.*, 41: 1175-1178.

Rigaud T, Juchault P, 1993. Conflict between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics*, 133(2): 247-252.

Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M, 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 250: 91-98.

Rowley SM, Raven RJ, McGraw EA, 2004. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Curr. Microbiol.*, 49: 208-214.

Sakamoto JM, Feinstein J, Rasgon JL, 2006. *Wolbachia* infection in the Cimicidae: museum specimens as an untapped resource for endosymbiont surveys. *App. Environ. Microbiol.*, 72(5): 3161-3167.

Stouthamer R, Breeuwer JA, Hurst GD, 1999. *Wolbachia pipientis* microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 71-102.

Subandiyah S, Nikoh N, Tsuyumu S, Somowiyarjo S, Fukatsu T, 2000. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoological Science*, 17: 983-989.

van Meer MMM, Witteveldt J, Stouthamer R, 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia*, based on the *wsp* gene. *Insect Mol. Biol.*, 8: 399-408.

Vandekerckhove TMT, Watteyne S, Willems S, Swings JG, Mertens J, Gillis M, 1999. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for *Wolbachia* taxonomy. *FEMS Microbiol. Lett.*, 180(2): 279-286.

Wang Z, Yin Y, Hu H, Yuan Q, Peng G, Xia Y, 2006. Development and application of molecular-based diagnosis for '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', the causal pathogen of citrus huanglongbing. *Plant Pathology*, 55: 630-638.

Werren JH, 1997. Biology of *Wolbachia*. *Ann. Rev. Entomol.*, 42: 587-609.

Werren JH, Zhang W, Guo LR, 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267: 1277-1285.

Zhou W, Rousset F, O'Neil S, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. Biol. Sci.*, 265(1395): 509-515.

（责任编辑：袁德成）